

B3



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : A61K 51/04		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/22497 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. Oktober 1994 (13.10.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE94/00371 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. März 1994 (29.03.94) (30) Prioritätsdaten: P 43 11 023.1 31. März 1993 (31.03.93) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTI- TUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HILGER, Christoph-Stephan [DE/DE]; Torfstrasse 16, D-13353 Berlin (DE). DINKEL- BORG, Ludger [DE/DE]; Ulmenstrasse 13, D-13595 Berlin (DE). KRAMP, Wolfgang [DE/DE]; Damwildsteig 41a, D-13503 Berlin (DE). SCHIER, Hans-Martin [DE/DE]; Schillerstrasse 27, D-10625 Berlin (DE). (74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D- 14129 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, HU, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LÜ, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(54) Title: CHELATING AGENTS OF THE TYPE $\text{XN}_1\text{S}_1\text{O}_1$ FOR RADIOACTIVE ISOTOPES, METAL COMPLEXES THEREOF, AND THEIR USE IN DIAGNOSIS AND THERAPY (54) Bezeichnung: CHELATBILDNER VOM TYP $\text{XN}_1\text{S}_1\text{O}_1$ FÜR RADIOAKTIVE ISOTOPE, DEREN METALLKOMPLEXE UND IHRE VERWENDUNG IN DIAGNOSTIK UND THERAPIE (57) Abstract Novel bifunctional chalcogenic-atom-discontinuous chelating agents, pharmaceutical preparations containing them, their use in radio diagnosis and radio therapy, and methods of preparing them. The invention concerns compounds of the general formula (I): M-L, in which M is a radioisotope of Tc or Re, and L is a ligand of general formula (II). Surprisingly, it has been found that the bifunctional chalcogenic- atom-discontinuous chelating agents described, and their coupling products with specifically enriching compounds, are eminently suitable for use in the production of radiodiagnostic or radiotherapeutic compounds.			
(57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft neue bifunktionelle chalkogen-atom-unterbrochene Chelatbildner, diese Verbindungen enthaltende pharmazeutis- che Mittel, ihre Verwendung in der Radiodiagnostik und Radiotherapie sowie Verfahren zur Herstellung dieser Verbindungen. In der erfindungsgemäßen Verbindung der allgemeinen Formel (I): M-L, steht M für ein Radioisotop von Tc oder Re und L für einen Liganden der allgemeinen Formel (II). Überraschenderweise wurde gefunden, daß sich die neuen, bifunktionellen, chalkogenatom-unterbrochenen Chelat- bildner und deren Kopplungsprodukte mit sich spezifisch anreichernden Verbindungen hervorragend zur Herstellung von Radiodiagnostika bzw. Radiotherapeutika eignen.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

CHELATBILDNER VOM TYP XN1S101 FÜR RADIOAKTIVE ISOTOPE,
DEREN METALLKOMPLEXE UND IHRE VERWENDUNG
IN DIAGNOSTIK UND THERAPIE

Die Erfindung betrifft neue bifunktionelle chalkogen-atom-unterbrochene Chelatbildner, diese Verbindungen enthaltende pharmazeutische Mittel, ihre Verwendung in der Radiodiagnostik und Radiotherapie sowie Verfahren zur Herstellung dieser Verbindungen und Mittel.

Die Anwendungen von Komplexbildnern für radioaktive Isotope bzw. ihre Komplexe mit radioaktiven Metallen in der Radiodiagnostik und Radiotherapie ist seit langem bekannt. Für die Radiodiagnostik wird am häufigsten das Radionuklid Technetium-99m verwendet, das auf Grund seiner günstigen physikalischen Eigenschaften (keine Korpuskularstrahlung, geringe Halbwertszeit von 6.02 h, gute Detektierbarkeit durch 140 keV γ -Strahlung) und geringen biologischen Halbwertszeit und einfache Verfügbarkeit besonders gut für eine in vivo Anwendung geeignet ist. Zur Bildung von Technetium-99m-Komplexen wird Pertechnetat zunächst aus einem Nuklidgenerator gewonnen und durch Verwendung geeigneter Reduktionsmittel (z. B. SnCl_2 , $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ etc.) in eine niedrigere Oxidationsstufe überführt, die anschließend durch einen geeigneten Chelator stabilisiert wird. Da Technetium in einer Reihe von Oxidationsstufen (+ 7 bis - 1) vorliegen kann, die die pharmakologischen Eigenschaften durch Veränderungen der Ladung eines Komplexes stark verändern können, ist es notwendig, Chelatoren bzw. Komplexliganden für Technetium-99m bereitzustellen, die Technetium sicher, fest und stabil in einer definierten Oxidationsstufe binden können, um zu verhindern, daß durch in vivo ablaufende Redoxprozesse bzw. Technetium-freisetzungen aus dem entsprechenden Radiodiagnostika eine unerwünschte Biodistribution stattfindet, die eine sichere Diagnostik entsprechender Erkrankungen erschwert.

Als geeignete Komplexbildner für Technetium und Rheniumisotope gelten z. B. cyclische Amine (Troutner, D. E. et al.; J. Nucl. Med. 21, 443 (1980)), die aber den Nachteil haben, daß sie erst ab einem pH > 9 in der Lage sind Technetium-99m in guten Ausbeuten zu binden. N_2O_2 -Systeme (Pillai, M. R. A., Troutner, D. E. et al.; Inorg. Chem. 29, 1850 (1990)) befinden sich in der klinischen Anwendung. Nichtcyclische N_4 -Systeme wie z. B. das HMPAO haben als großen Nachteil ihre geringe Komplexstabilität. Tc-99m-HMPAO muß wegen seiner Instabilität (Ballinger, J. R. et al., Appl. Radiat. Isot. 42, 315 (1991); Billingham, M. W. et al., Appl. Radiat. Isot. 42, 607 (1991)) sofort nach seiner Markierung appliziert werden, damit der Anteil an Zerfallsprodukten, die eine andere Pharmakokinetik und Ausscheidung besitzen, klein gehalten werden kann. Solche radiochemischen Verunreinigungen erschweren die Erkennung von zu diagnostizierenden Erkrankungen. Eine Kopplung dieser Chelate bzw. Chelatbildner an andere, sich selektiv in Krankheitsherden anreichernde Substanzen ist nicht mit einfachen Mitteln zu lösen, so daß sich diese im allgemeinen unspezifisch im Organismus verteilen.

N_2S_2 -Chelatoren (Bormans, G. et al.; Nucl. Med. Biol., 17, 499 (1990)) wie z. B. Ethylendicystein (EC; Verbruggen, A. M. et al.; J. Nucl. Med. 33, 551 (1992)) erfüllen zwar die Forderung nach hinreichender Stabilität des entsprechenden Technetium-99m-Komplexes, bilden aber erst ab einem pH-Wert des Komplexierungsmediums > 9 . Radiodiagnostika mit einer Reinheit von größer 69 %. N_3S -Systeme (Fritzburg, A.; EPA 0 173 424 und EPA 0 250 013) bilden zwar stabile Technetium-99m-Komplexe,

müssen aber zum Einbau des Radioisotops auf Temperaturen von ca. 100 °C erhitzt werden.

Ein weiterer Nachteil der N_2S_2 und N_3S -Systeme besteht darin, daß diese teilweise rasch und ohne spezifische Anreicherung vom Organismus ausgeschieden werden, so daß diese nur als Nierenfunktionsdiagnostika in der Klinik Anwendung finden und somit eine beschränkte Verwendbarkeit besitzen. In den letzten Jahren ist das Verlangen nach sich spezifisch in erkrankten Geweben anreichernden Radiodiagnostika gestiegen. Dies kann erreicht werden, wenn Komplexbildner leicht an sich selektiv anreichernde Substanzen gekoppelt werden können und dabei ihre günstigen Komplexierungseigenschaften nicht verlieren. Da es aber sehr häufig dazu kommt, daß nach Kopplung eines Komplexbildners unter Nutzung einer seiner funktionellen Gruppen an ein solches Molekül eine Abschwächung der Komplexstabilität beobachtet wird, erscheinen die bisherigen Ansätze zur Kupplung von Chelatbildnern an sich selektiv anreichernde Substanzen wenig zufriedenstellend, da ein diagnostisch nicht tolerierbarer Anteil des Isotops aus dem Konjugat in vivo freigesetzt wird (Brechbiel, M. W. et al.; Inorg. Chem. 1986, 25, 2772). Es ist deswegen notwendig bifunktionelle Komplexbildner darzustellen, die sowohl funktionelle Gruppen zur Bindung des gewünschten Metallions als auch eine (andere, mehrere) funktionelle Gruppe zur Bindung des sich selektiv anreichernden Moleküls tragen. Solche bifunktionellen Liganden ermöglichen eine spezifische, chemische definierte Bindung von Technetium- oder Rhenium-Isotopen an verschiedenste biologische Materialien, auch dann, wenn ein sogenanntes Prelabeling durchgeführt wird. Es wurden einige Chelatbildner, gekoppelt an monoklonale Antikörper

(z. B. EP Appl. 0 247 866 und 0 188 256) oder Fettsäuren (EP Appl. 0 200 492), beschrieben. Als Chelatbildner werden jedoch die bereits erwähnten N_2S_2 -Systeme verwendet, die auf Grund ihrer geringen Stabilität wenig geeignet sind. Da sowohl die sich selektiv anreichernden Substanzen in ihren Eigenschaften, sowie auch die Mechanismen, nach denen sie angereichert werden, sehr unterschiedlich sind, ist es weiterhin notwendig, den kopplungsfähigen Chelatbildner zu variieren und den physiologischen Anforderungen des Kopplungspartners hinsichtlich seiner Lipo- und Hydrophilie, Membranpermeabilität bzw. -impermeabilität etc. anpassen zu können.

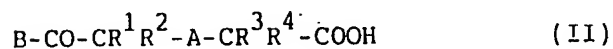
Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, stabile Komplexverbindungen, die gekoppelt oder fähig zur Kopplung an unterschiedliche sich selektiv anreichern- de Verbindungen sind, zur Verfügung zu stellen und solche koppelbaren Chelatoren oder Komplexe bereitzustellen, die über eine größere chemische Variationsbreite der Substituenten verfügen, um diese den oben referierten Erfordernissen anpassen zu können. Des weiteren liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, derartige Verbindungen und sie enthaltende pharmazeutische Mittel zur Verfügung zu stellen, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung zu schaffen.

Überraschender Weise wird diese Aufgabe erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß sich die neuen, ungewöhnlichen, bifunktionellen, chalkogenatom-unterbrochenen Chelatbildner und deren Kopplungsprodukte mit sich spezifisch anreichernden Verbindungen hervorragend zur Herstellung von Radiodiagnostika bzw. Radiotherapeutika eignen.

Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der allgemeinen Formel I



worin M für ein Radioisotop von Tc oder Re steht und L einen Liganden der allgemeinen Formel (II)



bedeutet, worin

A für ein Chalkogenatom O, S oder Se steht, R^1 , R^2 , R^3 und R^4 gleich oder unterschiedlich sind und jeweils für ein Wasserstoffatom und/oder für einen verzweigten oder unverzweigten C_1 - C_6 -Alkylrest stehen,

B einen Rest

- $NH-CR^5R^6-(CR^7R^8)_{n=1,2}-S-R^9$ darstellt, worin

R^5 und R^6 gleich oder unterschiedlich sind und jeweils ein Wasserstoffatom oder einen unverzweigten, verzweigten, cyclischen oder polycyclischen C_1 - C_{60} -Alkyl-, Alkenyl-, Polyalkenyl-, Alkynyl-, Polyalkynyl-, Aryl-, Alkylaryl- oder Arylalkylrest darstellen, welcher gegebenenfalls mit Hydroxy-, Oxo-, Oxy-, Carboxy-, Amino-carbonyl-, Alkoxy-carbonyl-, Amino-, Aldehyd- oder Alkoxy-Gruppen mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen substituiert ist und/oder gegebenenfalls durch ein oder mehrere Heteroatome aus der Reihe O, N, S, P, As, Se unterbrochen und/oder substituiert ist,

R^7 und R^8 gleich oder unterschiedlich sind und jeweils für ein Wasserstoffatom und/oder für einen verzweigten oder unverzweigten C_1-C_6 -Alkylrest steht,

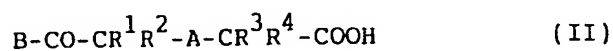
R^9 für ein Wasserstoffatom, für einen verzweigten oder unverzweigten C_1-C_6 -Alkylrest oder für eine Schwefelschutzgruppe und

R^5 und R^6 gegebenenfalls zusammen mit den sie verbindenden Gruppen einen gegebenenfalls mit Hydroxy-, Oxo-, Oxy- oder Alkoxy-Gruppen mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen substituierten 4- bis 8-gliedrigen Ring bilden.

Bevorzugte Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zeichnen sich dadurch aus, daß R^1 , R^2 , R^3 und R^4 Wasserstoffatome darstellen und A ein Schwefelatom ist.

Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zeichnen sich dadurch aus, daß R^5 und R^6 unterschiedlich sind und R^6 , R^7 und R^8 jeweils für ein Wasserstoffatom stehen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die neuen, bifunktionellen chalcogenatom-unterbrochenen Liganden der allgemeinen Formel (II)



worin

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , A und B die vorstehend angegebene Bedeutung haben.

Bevorzugt erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zeichnen sich dadurch aus, daß A ein

Schwefelatom ist und R^1 , R^2 , R^3 und R^4 Wasserstoffatome darstellen.

Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel (II) zeichnen sich dadurch aus, daß R^5 und R^6 unterschiedlich sind und R^6 , R^7 und R^8 jeweils für ein Wasserstoffatom stehen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Konjugate, enthaltend eine Verbindung der allgemeinen Formel (I und/oder II) und sich selektiv in erkrankten Gewebe anreichernden Substanzen, wobei zwischen diesen eine kovalente Bindung besteht und diese im Falle von Carboxy- oder Aminogruppen enthaltenden Substanzen wie Peptiden, Proteinen, Antikörpern oder deren Fragmente amidisch, oder im Falle von Hydroxygruppen enthaltenden Substanzen wie Fettalkoholen esterartig oder im Falle von Aldehydgruppen enthaltenden Substanzen imidisch vorliegt.

Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Konjugate zeichnen sich dadurch aus, daß die sich in erkrankten Gewebe anreichernden Substanzen Peptide wie Endotheline, Teilsequenzen von Endothelinen, Endothelin-Analoga, Endothelin-Derivate oder Endothelin-Antagonisten bedeuten.

Bei weiteren bevorzugten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Konjugate weisen die Peptide die folgenden Sequenzen

Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Trp-Leu-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-
Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Cys-Thr-Cys-Phe-Thr-Tyr-Lys-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-
Tyr-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Cys-Ser-Ala-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-Tyr
Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Cys-Ser-Cys-Asn-Ser-Trp-Leu-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-
Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Cys-Ser-Cys-Lys-Asp-Met-Thr-Asp-Lys-Glu-Cys-Leu-Asn-
Phe-Cys-His-Gln-Asp-Val-Ile-Trp,

Ala-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-
Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Ala-Ser-Ala-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-Tyr-
Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Trp-Leu-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-Tyr-
Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

N-Acetyl-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-His-
Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

die Teilsequenz

His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

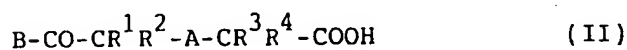
oder die cyclischen Aminosäuresequenzen

Cylo-(DTrp-DAsp-Pro-DVal-Leu),

Cyclo-(DGlu-Ala-alloDile-Leu-DTrp)

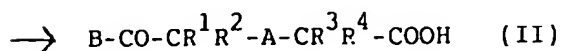
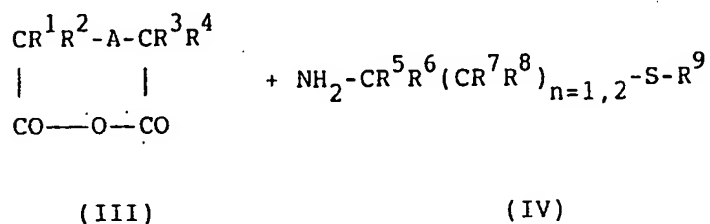
auf.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) erfolgt dadurch, daß man Technetium-99m oder Re in Form von Pertechnetat oder Perrhenat in Gegenwart eines Reduktionsmittels und gegebenenfalls eines Hilfsliganden mit einer Verbindung der allgemeinen Formel (II)



worin R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , A und B die vorstehend angegebene Bedeutung haben, umgesetzt.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Liganden der allgemeinen Formel (II) erfolgt dadurch, daß man Verbindungen der allgemeinen Formel (III) mit Verbindungen der allgemeinen Formel (IV) gemäß nachfolgendem Reaktionsschema



umsetzt,
worin R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , A und B die vorstehend angegebene Bedeutung haben.

Diese Umsetzungen werden in polaren und unpolaren, aprotischen Lösungsmitteln wie beispielsweise Dichlormethan, Tetrahydrofuran, Chloroform, 1,4-Dioxan, DMF oder DMSO bei Temperaturen zwischen - 30 und + 100 °C unter Zugabe einer Hilfsbase zum Abfangen der freiwerdenden Säuren durchgeführt. Solche können beispielsweise sein: tertiäre Amine, Alkali- und Erdalkalihydroxide, Alkali- und Erdalkalicarbonate.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit, zur Herstellung von Radiopharmaka, bestehend aus einer Verbindung der allgemeinen Formel (II) oder einem erfindungsgemäßen Konjugat enthaltend Verbindungen der allgemeinen Formel (I und/oder II) und sich selektiv in Geweben anreichernden Substanzen, einem Reduktionsmittel und gegebenenfalls einem Hilfsliganden, die in trockenem Zustand oder in Lösung vorliegen, einer Gebrauchsanweisung mit einer Reaktionsvorschrift zur Umsetzung der beschriebenen Verbindungen mit Technetium-99m oder Re in Form einer Pertechnetatlösung oder Perrhenatlösung.

Gegenstand der Erfindung ist auch eine radiopharmazeutische Zusammensetzung zur nicht invasiven in vivo Darstellung von Rezeptoren und rezeptorhaltigem Gewebe und/oder von atherosklerotischen Plaques. Sie enthält eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) oder ein erfindungsgemäßes Konjugat enthaltend Verbindungen der allgemeinen Formel (I und/oder II) und sich selektiv in Geweben anreichernden Substanzen, gegebenenfalls mit den in der Galenik üblichen Zusätzen, wobei die Verbindung in einem Kit mit Technetium-99m oder Re in Form einer Pertechnetatlösung oder Perrhenatlösung zubereitet wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Methode zur Durchführung einer radiodiagnostischen Untersuchung, wobei die radiopharmazeutische Zusammensetzung in einer Menge von 0,1 bis 30 mCi, bevorzugt von 0,5 bis 10 mCi pro 70 kg Körpergewicht einem Patienten verabreicht und die vom Patienten abgegebene Strahlung aufgezeichnet wird.

Überraschenderweise zeigten viele der synthetisierten mit Technetium-99m oder Re markierten Chelate eine höhere Stabilität als vergleichbare N_2S_2 - und N_3S -Systeme, die in der Literatur beschrieben sind. So konnten z. B. bei einer erfindungsgemäßen Substanz (Beispiel 2 a, 2 b), die an ein Fettalkohol gekoppelt wurde, keine Zersetzungsprodukte nach 23 h beobachtet werden. Auch konnte durch Wettbewerbsversuche festgestellt werden, daß die in dieser Erfindung beschriebenen Tc-99m- oder Re-Chelatoren besser als die vergleichbaren N_2S_2 , N_3S und Propylenaminooxium-Systeme komplexieren. Die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Chelate und Chelatbildner sind damit eindeutig besser für diagnostische und therapeutische Zwecke geeignet als die bisher bekannten Systeme. Ein besonderer Vorteil der erfindungsgemäßen Chelatoren besteht darin, daß deren Synthesen ohne Verwendung von Schwefelschutzgruppen geführt werden können. Dies macht deren Synthese sehr einfach und zusätzlich bieten speziell solche erfindungsgemäß beschriebenen Verbindungen den Vorteil, daß nach radiochemischer Markierung keine weiteren Fremdmoleküle in den zur Radiodiagnostik bzw. Radiotherapie, z. B. intravenös zu applizierenden Lösungen, enthalten sind, die häufig die Biodistribution des Radiopharmakons stören und damit den diagnostischen Informationsgehalt nachteilig beeinflussen können. Außerdem können

die Markierungen an solche Liganden bzw. deren Kopplungsprodukte an sich selektiv in erkrankten Geweben anreichernden Substanzen unter sehr milden Bedingungen vorgenommen werden. So gelingt die Markierung der erfindungsgemäßen Liganden bzw. der Kopplungsprodukte an sich selektiv in erkrankten Geweben anreichernden Substanzen bei Raumtemperatur und bei physiologischem pH-Wert, ohne daß vorher unter Einwirkung von Basen, Säuren oder anderen dem Fachmann bekannten Hilfsstoffen, die Schutzgruppen abzuspalten wären. Dies bietet Gewähr, daß durch solche Hilfsstoffe die häufig sehr empfindlichen, sich selektiv in erkrankten Geweben anreichernden Substanzen nicht chemisch verändert werden, was häufig deren selektive Anreicherung in erkranktem Gewebe herabsetzt und somit den Informationsgehalt bei der Radiodiagnostik nachteilig beeinflussen würde.

Dennoch können natürlich auch hier Schwefelschutzgruppen Verwendung finden, wenn die eben geschilderten Nachteile in Kauf genommen werden können. Deren Etablierung an Schwefelatomen bzw. deren Abspaltung geschieht dann nach Methoden, die dem Fachmann bekannt sind. Die Kopplung an sich selektiv in erkrankten Geweben anreichernden Substanzen erfolgt ebenfalls nach an sich dem Fachmann bekannten Methoden (z. B. Fritzberg et al.; J. Nucl. Med. 26, 7 (1987)), beispielsweise durch Reaktionen von elektrophilen Gruppen des Komplexliganden mit nukleophilen Zentren der sich selektiv in erkrankten Geweben anreichernden Substanzen. Ansonsten werden nukleophile Gruppen des Chelators mit elektrophilen Gruppen der sich selektiv in erkrankten Geweben anreichernden Substanzen gekoppelt.

Als Kopplungspartner sind u. a. verschiedene Biomoleküle vorgesehen. Liganden, die an spezifische Rezeptoren binden und so ein in ihrer Rezeptordichte verändertes Gewebe erkennen können, hierzu gehören u. a. Peptide und Steroidhormone, Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter. Mit Liganden für Steroidhormonrezeptoren wurde die Möglichkeit einer verbesserten Diagnostik von Brust und Prostatacarcinomen aufgezeigt (S. J. Brandes and J. A. Katzenellenbogen, Nucl. Med. Biol., 15, 53, 1988).

Verschiedentlich weisen Tumorzellen eine veränderte Dichte von Rezeptoren für Peptidhormone oder Wachstumsfaktoren, wie z. B. den "epidermal growth factor" (EgF) auf. Die Konzentrationsunterschiede konnten zur selektiven Anreicherung von Cytostatika in Tumorzellen genutzt werden (E. Aboud-Pirak et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3778, 1989). Vielfach konnten mit Positronen-emittierenden Isotopen markierte Liganden für Neurorezeptoren zur Diagnostik verschiedener Hirnerkrankungen herangezogen werden. (J. J. Forst, Trends in Pharmacol. Sci., 7; 490, 1989). Weitere Biomoleküle sind in den Metabolismus der Zellen einschleusbare Metabolite, die einen veränderten Stoffwechsel erkennbar machen; hierzu gehören beispielsweise Fettsäuren, Saccharide, Peptide und Aminosäuren. Fettsäuren, gekoppelt an die instabileren N_2S_2 -Chelatbildner wurden in der EPA 0 200 492 beschrieben. Andere Stoffwechselprodukte wie Saccharide (Desoxyglucose), Lactat, Pyruvat und Aminosäuren (Leucin, Methylmenthionin, Glycin) wurden mit Hilfe der PET-Technik zur bildlichen Darstellung von veränderten Stoffwechselvorgängen herangezogen (R. Weinreich, Swiss. Med, 8, 10, 1986). Auch nicht biologische Substanzen wie Misonidazol und seine Derivate, die sich in Geweben bzw. Gewebeteilen mit reduzierter

Sauerstoffkonzentration irreversibel an Zellbestandteile binden, können zur spezifischen Anreicherung von radioaktiven Isotopen und somit zur bildlichen Darstellung von Tumoren oder ischämischen Regionen herangezogen werden (M. E. Shelton, J. Nucl. Med. 30; 351, 1989). Schließlich ist auch die Kopplung der bifunktionellen Chelatbildner an monoklonale Antikörper bzw. deren Fragmente möglich. Besonders günstig erweisen sich Kopplungsprodukte der erfindungsgemäßen Chelatoren bzw. deren Komplexe mit Technetium-99m oder Re mit Fettalkoholen, Fettalkoholderivaten oder Fettaminen bzw. deren Derivate oder mit Endothelinen, Teilsequenzen von Endothelinen, Endothelin-Analoga, Endothelin-Derivaten oder Endothelin-Antagonisten zur Detektion von atherosklerotischen Gefäßerkrankungen. Die Derivate wurden WHHL-Kaninchen appliziert, die durch einen genetischen Defekt des LDL-Rezeptors hohe LDL-Konzentrationen im Blut aufweisen und somit atherosklerotische Läsionen aufweisen. Etwa 4 bis 5 h nach i. V. Applikation der Derivate in WHHL-Kaninchen konnten Anreicherungsquotienten im Vergleich zu nicht geschädigtem Gewebe von 3 bis 40 in den atheromatösen Plaques nachgewiesen werden. Dadurch können atherosklerotische Gefäßbereiche mit den in der Radiodiagnostik üblichen Methoden (z. B. Gamma-Szintillationskamera) nachgewiesen werden. Bisher konnten nur sehr späte Stadien der Atherogenese mit invasiven Verfahren (z. B. Arteriografie) diagnostiziert werden. Die erfindungsgemäßen Substanzen bieten deshalb den entscheidenden Vorteil, viel frühere Stadien der Atherosklerose mit nicht invasiven Verfahren zu diagnostizieren.

Es ist unerheblich, ob eine Markierung der Chelatbildner mit Tc-99m oder Rhenium-Isotopen vor oder nach der

Kopplung an das sich selektiv anreichernde Molekül durchgeführt wird. Für eine Kopplung an das sich selektiv anreichernde Molekül nach einer Komplexierung ist jedoch Voraussetzung, daß die Umsetzung des radioaktiven Komplexes mit der sich anreichernden Verbindung schnell, unter schonenden Bedingungen und nahezu quantitativ abläuft, so daß keine anschließende Aufreinigung erforderlich ist.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel erfolgt in an sich bekannter Weise, in dem man die erfindungsgemäßen Komplexbildner unter Zusatz eines Reduktionsmittels, vorzugsweise Zinn(II)salzen wie -chlorid oder -tartrat - und gegebenenfalls unter Zugabe der in der Gelenik üblichen Zusätze - in wäßrigem Medium löst und anschließend sterilfiltriert. Geeignete Zusätze sind beispielsweise physiologisch unbedenkliche Puffer (z. B. Tromethamin), geringe Zusätze von Elektrolyten (z. B. Natriumchlorid), Stabilisatoren (z. B. Gluconat, Phosphate oder Phosphonate). Das erfindungsgemäße pharmazeutische Mittel liegt in Form einer Lösung oder in lyophilisierter Form vor und wird kurz vor der Applikation mit einer Lösung Tc-99m Pertechnetat, eluiert aus kommerziell erhältlichen Generatoren, oder einer Perrhenatlösung versetzt.

Bei der nuklearmedizinischen in-vivo-Anwendung werden die erfindungsgemäßen Mittel in Mengen von $1 \cdot 10^{-5}$ bis $5 \cdot 10^4$ nmol/kg Körpergewicht, vorzugsweise in Mengen zwischen $1 \cdot 10^{-3}$ bis $5 \cdot 10^2$ nmol/kg Körpergewicht dosiert. Ausgehend von einem mittleren Körpergewicht von 70 kg beträgt die Radioaktivitätsmenge für diagnostische Anwendungen zwischen 0,05 und 50 mCi, vorzugsweise 5 bis 30 mCi pro Applikation. Für therapeutische Anwen-

dungen werden zwischen 5 und 500 mCi, vorzugsweise 10 bis 350 mCi appliziert. Die Applikation erfolgt normalerweise durch intravenöse, intraarterielle, peritoneale oder intratumorale Injektion von 0,1 bis 2 ml einer Lösung der erfindungsgemäßen Mittel. Bevorzugt ist die intravenöse Applikation.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der näheren Erläuterung des Erfindungsgegenstandes.

Beispiel 1 a

N-(2-Mercapto-1-(methoxycarbonyl)-ethyl)-thiodiglycolsäuremonoamid

Zu einer Lösung aus 17,16 g (0,1 mol) Cysteinmethylesterhydrochlorid in 500 ml wasserfreiem Dichlormethan und 20,24 g (0,2 mol) Triethylamin unter Argonatmosphäre tropft man 13,21 g (0,1 mol) Thiodiglycolsäureanhydrid. Anschließend läßt man 16 h bei Raumtemperatur rühren und wäscht die Lösung mit 2-%iger wäßriger Citronensäure. Nach Trocknung über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck verdampft und der ölige Rückstand durch Verreiben mit Diethylether zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 18,73 g (70,1 %), weißes Pulver

Analyse: bezogen auf die wasserfreie Substanz

Ber.: C 35,95 H 4,90 N 5,24 O 29,93 S 23,99

Gef.: C 35,72 H 5,12 N 5,03 S 23,71

Beispiel 1 b

N-(2-Mercapto-1-(methoxycarbonyl)-ethyl)-thiodiglycol-säuremonoamid, Technetium-99m-Komplex

10 mg des unter Beispiel 1 a hergestellten Liganden werden in 1,0 ml 0,5 M Phosphat-Puffer pH 7,5 gelöst. 50 μ l dieser Ligand-Lösung werden mit 250 μ l Phosphat-Puffer pH 8,5, 50 μ l einer desoxygenierten wäßrigen Citratlösung (50 mg/ml), 2,5 μ l einer desoxygenierten wäßrigen Zinn(II)chlorid-Lösung (5 mg/ml 0,05 N HCl) und 100 μ l einer Pertechnetat-Lösung (400 - 900 μ Ci) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird nach einer Inkubationszeit von 10 min mittels HPLC auf die Reinheit des gebildeten Tc-Komplexes untersucht: Hamilton PRP-1 Säule, 5 μ m, 125 x 4,6 mm; Gradientenelution von 100 % A nach 100 % B innerhalb von 7,5 min (Eluent A: Natriumhydrogenphosphat 0,005 M, pH 7,4; Eluent B: Acetonitril/Natriumhydrogenphosphat 0,005 M, pH 7,4 (75/25); 2,0 ml/min. Die radiochemische Reinheit ist > 98 %.

Beispiel 2 a

N-(2-Mercapto-1-(decyloxy-carbonyl)-ethyl)-thiodiglycol-säuremonoamid

Zu einer Lösung aus 2,98 g (10 mmol) Cysteindecylesterhydrochlorid und 2,02 g (20 mol) Triethylamin in 250 ml wasserfreiem Dichlormethan unter Argonatmosphäre tropft man 1,32 g (10 mol) Thiodiglycolsäureanhydrid, gelöst

in 50 ml wasserfreiem Dichlormethan. Anschließend läßt man 16 h bei Raumtemperatur rühren und wäscht die Lösung mit 2-%iger wäßriger Citronensäure. Nach Trocknung über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck verdampft und der ölige Rückstand durch Verreiben mit Diethylether zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 3,37 g (85,6 %), weißes Pulver

Analyse: bezogen auf die wasserfreie Substanz

Ber.: C 51,88 H 7,94 N 3,56 O 20,33 S 16,29

Gef.: C 51,63 H 8,07 N 3,37 S 16,02

Beispiel 2 b

N-(2-Mercapto-1-(decyloxy-carbonyl)-ethyl)-thiodiglycol-säuremonoamid, Technetium-99m-Komplex

10 mg des unter Beispiel 2 a hergestellten Liganden werden in 1,0 ml 0,5 M Phosphat-Puffer pH 7,5 gelöst. 50 µl dieser Ligand-Lösung werden mit 250 µl Phosphat-Puffer pH 7,5, 50 µl einer desoxygenierten wäßrigen Citratlösung (50 mg/ml), 2,5 µl einer desoxygenierten wäßrigen Zinn(II)chlorid-Lösung (5 mg/ml 0,05 N HCl) und 100 µl einer Pertechetat-Lösung (400 - 900 µCi) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird nach einer Inkubationszeit von 10 min mittels HPLC auf die Reinheit des gebildeten Tc-Komplexes untersucht: Hamilton PRP-1 Säule, 5 µm, 125 x 4,6 mm; Gradientenelution von 100 % A nach 100 % B innerhalb von 7,5 min (Eluent A: Na-

triumhydrogenphosphat 0,005 M, pH 7,4; Eluent B: Acetonitril/Natriumhydrogenphosphat 0,005 M, pH 7,4 (75/25); 2,0 ml/min. Die radiochemische Reinheit ist 98 %.

Beispiel 3 a

N-(2-Oxo-1-tetrahydrothiophen -3-yl)-thiodiglycolsäuremonoamid

Zu einer Lösung von 15,36 g (0,1 mol) Homocysteinthiolactonhydrochlorid und 20,24 g (0,2 mol) Triethylamin in 500 ml wasserfreiem Dichlormethan unter Argonatmosphäre tropft man 13,21 g (0,1 mmol) Thiodiglycolsäureanhydrid, gelöst in 250 ml wasserfreiem Dichlormethan. Anschließend läßt man 16 h bei Raumtemperatur rühren und wäscht die Lösung mit 2-%iger wäßriger Citronensäure. Nach Trocknung über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck verdampft und der ölige Rückstand durch Verreiben mit Diethylether zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 22,73 g (91,2 %), weißes Pulver

Analyse: bezogen auf die wasserfreie Substanz

Ber.: C 38,54 H 4,45 N 5,62 O 25,67 S 25,72

Gef.: C 38,37 H 4,68 N 5,41 S 25,47

Beispiel 3 b**N-(3-Mercapto-1-(octylaminocarbonyl)-propyl)-thio-
diglycolsäuremonoamid**

Zu einer Lösung aus 2,49 g (10 mmol) des unter Beispiel 3 a hergestellten Thiolactonderivats des Thio-
diglycolsäuremonoamids in 30 ml Ethanol gibt man unter Argonatmosphäre 30 ml Octylamin. Man rührt 4 h bei Raumtemperatur, dampft im Feinvakuum ein und versetzt den Rückstand mit 200 ml 2-%iger wäßriger Citronensäure und 200 ml Dichlormethan. Es wird gut durchgerührt und die organische Phase nach Abtrennung über Natriumsulfat getrocknet. Man verdampft das Lösungsmittel unter vermindertem Druck und kristallisiert das ölige Rohprodukt durch Verreiben mit Diethylether.

Ausbeute: 878 mg (23,2 %), weißes Pulver

Analyse: bezogen auf die wasserfreie Substanz

Ber.:	C 50,77	H 7,99	N 7,40	O 16,91	S 16,94
Gef.:	C 50,48	H 8,13	N 7,15		S 16,71

Beispiel 3 c**N-(3-Mercapto-1-(octylaminocarbonyl)-propyl)-thio-
diglycolsäuremonoamid, Technetium-99m-Komplex**

10 mg des unter Beispiel 3 b hergestellten Liganden werden in 1,0 ml Ethanol gelöst. 50 μ l dieser Ligand-Lösung werden mit 250 μ l Phosphat-Puffer pH 8,5, 50 μ l

einer desoxygenierten wässrigen Citratlösung (50 mg/ml), 2,5 μ l einer desoxygenierten wässrigen Zinn(II)-chlorid-Lösung (5 mg/ml 0,05 N HCl) und 100 μ l einer Pertechnetat-Lösung (400 - 900 μ Ci) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird nach einer Inkubationszeit von 10 min mittels HPLC auf die Reinheit des gebildeten Tc-Komplexes untersucht: Hamilton PRP-1 Säule, 5 μ m, 125 x 4,6 mm; Gradientenelution von 100 % A nach 100 % B innerhalb von 7,5 min (Eluent A: Natriumhydrogenphosphat 0,005 M, pH 7,4; Eluent B: Acetonitril/Natriumhydrogenphosphat 0,005 M, pH 7,4 (75/25)); 2,0 ml/min. Die radiochemische Reinheit ist >95 %.

Beispiel 4 a

N-(3-Mercapto-1-(2-methoxyethylamino-carbonyl)-propyl)-thiodiglycolsäuremonoamid

Zu einer Lösung aus 2,49 g (10 mmol) des unter Beispiel 3 a hergestellten Thiolactonderivats des Thiodiglycolsäuremonoamids in 30 ml Ethanol gibt man unter Argonatmosphäre 30 ml 2-Methoxy-ethylamin. Man rührt 5 h bei Raumtemperatur, dampft unter vermindertem Druck ein und versetzt den Rückstand mit 200 ml 2-%iger wässriger Citronensäure und 200 ml Dichlormethan. Es wird gut durchgerührt und die organische Phase nach Abtrennung über Natriumsulfat getrocknet. Man verdampft das Lösungsmittel unter vermindertem Druck und kristallisiert das ölige Rohprodukt durch Verreiben mit Diethylether.

Ausbeute: 734 mg (22,6 %), weißes Pulver

Analyse: bezogen auf die wasserfreie Substanz

Ber.: C 40,73 H 6,21 N 8,64 O 24,66 S 19,76

Gef.: C 40,47 H 6,49 N 8,38 S 19,51

Beispiel 4 b

N-(3-Mercapto-1-(2-methoxyethylamino-carbonyl)-propyl)-thiodiglycolsäuremonoamid, Technetium-99m-Komplex

10 mg des unter Beispiel 4 a hergestellten Liganden werden in 1,0 ml Ethanol gelöst. 50 μ l dieser Ligand-Lösung werden mit 250 μ l Phosphat-Puffer pH 8,5, 50 μ l einer desoxygenierten wäßrigen Citratlösung (50 mg/ml), 2,5 μ l einer desoxygenierten wäßrigen Zinn(II)chlorid-Lösung (5 mg/ml 0,05 N HCl) und 100 μ l einer Pertechne-tat-Lösung (400 - 900 μ Ci) versetzt. Das Reaktionsge-misch wird nach einer Inkubationszeit von 10 min mit-tels HPLC auf die Reinheit des gebildeten Tc-Komplexes untersucht: Hamilton PRP-1 Säule, 5 μ m, 125 x 4,6 mm; Gradientenelution von 100 % A nach 100 % B innerhalb von 7,5 min (Eluent A: Natriumhydrogenphosphat 0,005 M, pH 7,4; Eluent B: Acetonitril/Natriumhydrogenphosphat 0,005 M, pH 7,4 (75/25); 2,0 ml/min. Die radiochemische Reinheit ist > 95 %.

Beispiel 5 a**N-(3-Mercapto-1-(2-hydroxyethylamino-carbonyl)-propyl)-thiodiglycolsäuremonoamid**

Zu einer Lösung aus 2,49 g (10 mmol) des unter Beispiel 3 a hergestellten Thiolactonderivats des Thiodiglycolsäuremonoamids in 30 ml Ethanol gibt man unter Argonatmosphäre 30 ml 2-Aminoethanol. Man rührt 4 h bei Raumtemperatur, dampft im Feinvakuum ein und versetzt den Rückstand mit 200 ml 2-%iger Citronensäure und 200 ml Dichlormethan. Es wird gut durchgerührt und die organische Phase nach Abtrennung über Natriumsulfat getrocknet. Man verdampft das Lösungsmittel im Vakuum und kristallisiert das ölige Rohprodukt durch Verreiben mit Diethylether.

Ausbeute: 435 mg (14,0 %), weißes Pulver

Analyse: bezogen auf die wasserfreie Substanz

Ber.: C 38,70 H 5,85 N 9,03 O 25,77 S 20,66

Gef.: C 38,38 H 5,74 N 8,91 S 20,43

Beispiel 5 b**N-(3-Mercapto-1-(2-hydroxyethylaminocarbonyl)-propyl)-thiodiglycolsäuremonoamid, Technetium-99m-Komplex**

10 mg des unter Beispiel 5 a hergestellten Liganden werden in 1,0 ml Ethanol gelöst. 50 μ l dieser Ligand-Lösung werden mit 250 μ l Phosphat-Puffer pH 8,5, 50 μ l einer desoxygenierten wäßrigen Citratlösung (50 mg/ml), 2,5 μ l einer desoxygenierten wäßrigen Zinn(II)chlorid-

Lösung (5 mg/ml 0,05 N HCl) und 100 μ l einer Pertechne-
tat-Lösung (400 - 900 μ Ci) versetzt. Das Reaktionsge-
misch wird nach einer Inkubationszeit von 10 min mit-
tels HPLC auf die Reinheit des gebildeten Tc-Komplexes
untersucht: Hamilton PRP-1 Säule, 5 μ m, 125 x 4,6 mm;
Gradientenelution von 100 % A nach 100 % B innerhalb
von 7,5 min (Eluent A: Natriumhydrogenphosphat 0,005 M,
pH 7,4; Eluent B: Acetonitril/Natriumhydrogenphosphat
0,005 M, pH 7,4 (75/25); 2,0 ml/min. Die radiochemische
Reinheit ist >95 %.

Beispiel 6 a

**N-(3-Mercapto-1-(carbonyl-Gly-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp)-
propyl)-thiodiglycolsäureamid**

Zu einer Lösung von 853 mg (1 mmol) NH_2 -Gly-His-Leu-
Asp-Ile-Ile-Trp (hergestellt in Analogie zu Barany und
Merrifield, The Peptides: Analysis, Biology, Academic
Press, New York, 1980; Stewart and Young, Solid Phase
Peptides Syntheses, 2nd ed., Pierce Chemical W., Rock-
ford, II, 1984) und 404 mg (4 mmol) Triethylamin in 100
ml wasserfreiem Dimethylformamid unter Argonatmosphäre
gibt man 250 mg (1 mmol) des unter 3 a hergestellten
N-(2-Oxotetrahy-drothiophen-3-yl)-thiodiglycolsäureamid
und rührt das resultierende Reaktionsgemisch 12 h bei
Raumtemperatur. Nach beendeter Reaktion wird filtriert
und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezo-
gen. Das verbleibende Öl wird dreimal mit 50 ml Dime-
thylformamid versetzt und jeweils eingedampft. Man ver-
rührt den Rückstand mit 200 ml wasserfreiem Diethyl-

ether, worauf sich ein weißer Feststoff abscheidet, der abfiltriert wird. Zur Reinigung wird aus Dimethylformamid/Diethylethergemischen umkristallisiert.

Ausbeute: 282 mg (25,6 %), weißes Pulver

Analyse: bezogen auf die wasserfreie Substanz

Ber.: C 53,39 H 6,49 N 13,98 O 20,32 S 5,82

Gef.: C 53,17 H 6,63 N 13,74 S 5,61

Beispiel 6 b

N-(3-Mercapto-1-(carbonyl-Gly-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp)-propyl)-thiodiglycolsäureamid, Technetium-99m-Komplex

10 mg des unter Beispiel 6 a hergestellten Liganden werden in 1,0 ml Ethanol gelöst. 50 μ l dieser Ligand-Lösung werden mit 250 μ l Phosphat-Puffer pH 8,5, 50 μ l einer desoxygenierten wässrigen Citratlösung (50 mg/ml), 2,5 μ l einer desoxygenierten wässrigen Zinn(II)-chlorid-Lösung (5 mg/ml 0,05 N HCl) und 100 μ l einer Pertechetat-Lösung (400 - 900 μ Ci) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird nach einer Inkubationszeit von 10 min mittels HPLC auf die Reinheit des gebildeten Tc-Komplexes untersucht: Hamilton PRP-1 Säule, 5 μ m, 125 x 4,6 mm; Gradientenelution von 100 % A nach 100 B innerhalb von 7,5 min (Eluent A: Natriumhydrogenphosphat 0,005 M, pH 7,4; Eluent B: Acetonitril/Natriumhydrogenphosphat 0,005 M, pH 7,4 (75/25); 2,0 ml/min. Die radiochemische Reinheit ist > 97 %.

Beispiel 7

Anreicherung des N-(2-Mercapto-1-(decyloxy-carbonyl)-ethyl)-thiodiglycolsäuremonoamids, Technetium-99m-Komplex in atherosklerotischen Gefäßläsionen von WHHL-Kaninchen

Die Markierung des N-(2-Mercapto-1-(decyloxy-carbonyl)-ethyl)-thiodiglycolsäuremonoamids (hergestellt nach Beispiel 2 a) erfolgt wie in Beispiel 3 b beschrieben. 99,9 GBq (2,7 mCi) der nach Beispiel 3 b markierten Substanz wurde mit phosphatgepufferter Saline auf 1 ml verdünnt und einem narkotisierten WHHL-Kaninchen Rompun/Ketavet (1:2) über eine Ohrvene appliziert. 5 h nach Applikation wurde das Kaninchen getötet und sowohl eine Autoradiographie der Aorta als auch eine Sudan-III-Färbung zur Darstellung der atherosklerotischen Plaques durchgeführt (Abbildung 1). Der Anreicherungs-faktor zwischen normalen und atherosklerotischen Wand-bereichen betrug je nach Ausbildung der Plaques (Sudan-III-Färbung) zwischen 3 und 8.

P a t e n t a n s p r ü c h e

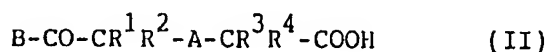
1. Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



worin

M für ein Radioisotop von Tc oder Re steht und

L einen Liganden der allgemeinen Formel (II)



bedeutet, worin

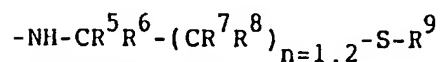
A für ein Chalkogenatom O, S oder Se steht,

R^1 , R^2 , R^3 und R^4 gleich oder unterschiedlich sind

und jeweils für ein Wasserstoffatom und/oder für

einen verzweigten oder unverzweigten C_1-C_6 -Alkyrest stehen,

B einen Rest



darstellt, worin

R^5 und R^6 gleich oder unterschiedlich sind und jeweils ein Wasserstoffatom oder einen unverzweigten, verzweigten, cyclischen oder polycyclischen C_1-C_{60} -Alkyl-, Alkenyl-, Polyalkenyl-, Alkinyl-, Polyalkinyl-, Aryl-, Alkylaryl- oder Arylalkylrest darstellen, welcher gegebenenfalls mit Hydroxy-, Oxy-, Oxo-, Carboxy-, Aminocarbonyl-, Alkoxycarbonyl-, Amino-, Aldehyd- oder Alkoxy-Gruppen mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen substituiert ist und/oder gegebenenfalls durch ein oder mehrere Heteroatome aus der Reihe O, N, S, P, As, Se unterbrochen und/oder sub-

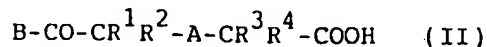
stituiert ist,

R^7 und R^8 gleich oder unterschiedlich sind und jeweils für ein Wasserstoffatom und/oder für einen verzweigten oder unverzweigten C_1-C_6 Alkylrest stehen,

R^9 für ein Wasserstoffatom, für einen verzweigten oder unverzweigten C_1-C_6 -Alkylrest oder für eine Schwefelschutzgruppe steht und

R^9 und R^5 gegebenenfalls zusammen mit den sie verbindenden Gruppen einen gegebenenfalls mit Hydroxy-, Oxo-, Oxy- oder Alkoxy-Gruppen mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen substituierten 4- bis 8-gliedrigen Ring bilden.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R^1 , R^2 , R^3 und R^4 Wasserstoffatome darstellen und A ein Schwefelatom ist.
3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß R^5 und R^6 unterschiedlich sind und R^6 , R^7 und R^8 jeweils für ein Wasserstoffatom stehen.
4. Liganden der allgemeinen Formel (II)



worin R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , A und B die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben.

5. Liganden nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß R^1 , R^2 , R^3 und R^4 Wasserstoffatome darstellen und A ein Schwefelatom ist.
6. Liganden nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß R^5 und R^6 unterschiedlich sind und R^6 , R^7 und R^8 jeweils für ein Wasserstoffatom stehen.
7. Konjugate, enthaltend eine Verbindung der allgemeinen Formel (I und/oder II) und sich selektiv in erkranktem Gewebe anreichernde Substanzen, wobei zwischen diesen eine kovalente Bindung besteht und diese im Falle von Carboxy- oder Aminogruppen enthaltenden Substanzen wie Peptiden, Proteinen, Antikörpern oder deren Fragmente amidisch oder im Falle von Hydroxygruppen enthaltenden Substanzen wie Fettalkoholen esterartig oder im Falle von Aldehydgruppen enthaltenden Substanzen imidisch vorliegt.
8. Konjugate nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die sich in erkrankten Gewebe anreichernden Substanzen Peptide wie Endotheline, Teilsequenzen von Endothelinen, Endothelin-Analoga, Endothelin-Derivate oder Endothelin-Antagonisten bedeuten.
9. Konjugate nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide die folgenden Sequenzen oder Teile davon aufweisen

Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-
Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Trp-Leu-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-
Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Cys-Thr-Cys-Phe-Thr-Tyr-Lys-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-
Tyr-Tyr-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Cys-Ser-Ala-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-
Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Cys-Ser-Cys-Asn-Ser-Trp-Leu-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-
Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Cys-Ser-Cys-Lys-Asp-Met-Thr-Asp-Lys-Glu-Cys-Leu-
Asn-Phe-Cys-His-Gln-Asp-Val-Ile-Trp,

Ala-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-
Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Ala-Ser-Ala-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-
Tyr-Phe-Ala-His-leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Trp-Leu-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-
Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

N-Acetyl-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-
His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

die Teilsequenz

His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp,

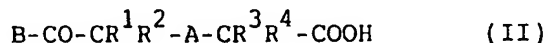
oder die cyclischen Aminosäuresequenzen

Cyclo-(DTrp-DAsp-Pro-DVal-Leu),

Cyclo-(DGLu-Ala-alloDile-Leu-DTrp)

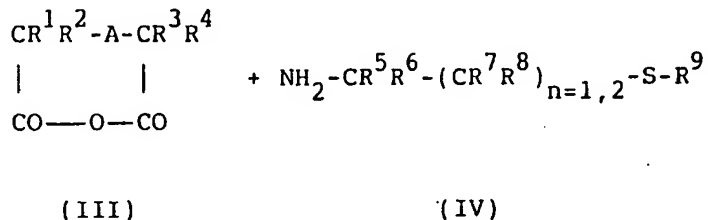
aufweisen.

10. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der allgemeinen Formel (I), dadurch gekennzeichnet, daß man Technetium-99m oder Re in Form von Pertechnetat oder Perrhenat in Gegenwart eines Reduktionsmittels und gegebenenfalls eines Hilfsliganden mit einer Verbindung der allgemeinen Formel (II)



worin R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , A und B die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben, umgesetzt.

11. Verfahren zur Herstellung von Liganden der allgemeinen Formel (II), dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der allgemeinen Formel (III) mit Verbindungen der allgemeinen Formel (IV) gemäß nachfolgendem Reaktionsschema



umsetzt

worin R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , A und B die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben.

12. Kit zur Herstellung von Radiopharmaka, bestehend aus einer Verbindung der allgemeinen Formel (II) gemäß einem der Ansprüche 4 bis 6 oder einem Konjugat gemäß einem der Ansprüche 7 bis 9, sowie einem Reduktionsmittel und gegebenenfalls einem Hilfslianden, die in trockenem Zustand oder in Lösung vorliegen, einer Gebrauchsanweisung mit einer Reaktionsvorschrift zur Umsetzung der beschriebenen Verbindungen mit Technetium-99m oder Re in Form einer Pertechnetatlösung oder Perrhenatlösung.
13. Radiopharmazeutische Zusammensetzung zur nicht invasiven in vivo Darstellung von Rezeptoren und rezeptorhaltigem Gewebe und/oder von atherosklerotischen Plaques, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 4 bis 6 oder ein Konjugat gemäß einem der Ansprüche 7 bis 9, sowie gegebenenfalls mit den in der Galenik üblichen Zusätzen, enthält, wobei die Verbindung in einem Kit nach Anspruch 12 mit Technetium-99m oder Re in Form einer Pertechnetatlösung oder Perrhenatlösung zubereitet wird.
14. Verfahren zur radiodiagnostischen Untersuchung, dadurch gekennzeichnet, daß eine radiopharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 13 in einer Menge von 0,1 bis 30 mCi, bevorzugt von 0,5 bis 10 mCi pro 70 kg Körpergewicht einem Patienten verabreicht und die vom Patienten abgegebene Strahlung aufgezeichnet wird.

1/1

Abbildung 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 94/00371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 A61K51/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 299 795 (NYCOMED) 18 January 1989 see claims ---	1-14
Y	EP,A,0 063 946 (AMERSHAM INTERNATIONAL) 3 November 1982 see claims ---	1-14
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 13, 27 September 1993, Columbus, Ohio, US; abstract no. 139795, see abstract & JP,A,5 070 481 (HITACHI CHEMICAL CO LTD) --- -/--	1-14



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- * 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- * 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

* 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

* 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

* 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 July 1994

Date of mailing of the international search report

16.08.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 94/00371

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>TETRAHEDRON, vol.38, no.11, 1982, OXFORD GB pages 2061 - 2067 R. MARCHELLI ET AL. 'CHIRAL AMINOACID CONTAINING LIGANDS-II. COMPLEXATION OF ALKALINE EARTH CATIONS' -----</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE94/00371

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-14
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Pleased see appendix !

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 94/00371

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0299795	18-01-89	AU-A- 1998088	13-02-89
		AU-B- 640263	19-08-93
		AU-A- 8343191	07-11-91
		DE-A- 3869251	23-04-92
		EP-A- 0466200	15-01-92
		WO-A- 8900557	26-01-89
		JP-T- 2504269	06-12-90
		US-A- 5198208	30-03-93

EP-A-0063946	03-11-82	JP-A- 57188527	19-11-82

JP-A-5070481	23-03-93	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 94/00371

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 5 A61K51/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 5 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP,A,0 299 795 (NYCOMED) 18. Januar 1989 siehe Ansprüche ---	1-14
Y	EP,A,0 063 946 (AMERSHAM INTERNATIONAL) 3. November 1982 siehe Ansprüche ---	1-14
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 13, 27. September 1993, Columbus, Ohio, US; abstract no. 139795, siehe Zusammenfassung & JP,A,5 070 481 (HITACHI CHEMICAL CO LTD) --- -/--	1-14



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

* A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

* E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

* L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

* O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

* P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* &* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. Juli 1994

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16. 08. 94

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Berte, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 94/00371

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>TETRAHEDRON, Bd.38, Nr.11, 1982, OXFORD GB Seiten 2061 - 2067 R. MARCHELLI ET AL. 'CHIRAL AMINOACID CONTAING LIGANDS-II. COMPLEXATION OF ALKALINE EARTH CATIONS' -----</p>	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/DE94/00371

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
 weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☒ Ansprüche Nr. 1-14
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
 Bitte siehe Anhang!

3. ☐ Ansprüche Nr.
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 94/00371

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0299795	18-01-89	AU-A- 1998088	13-02-89
		AU-B- 640263	19-08-93
		AU-A- 8343191	07-11-91
		DE-A- 3869251	23-04-92
		EP-A- 0466200	15-01-92
		WO-A- 8900557	26-01-89
		JP-T- 2504269	06-12-90
		US-A- 5198208	30-03-93
EP-A-0063946	03-11-82	JP-A- 57188527	19-11-82
JP-A-5070481	23-03-93	KEINE	